

**Biochemische Untersuchungen
an nicht standardisierten Plaques**

von

Thomas Michael Liebel

aus

Wlinsdorf/Teltow

1975 1 327

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Erlangen-Nürnberg

Biochemische Untersuchungen an nicht standardisierten Plaques

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Thomas Michael Liebel
aus
Wünsdorf/Teltow

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin der

Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. H.-J. Gülzow

Korreferent: Prof. Dr. A. Kröneke

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 1975

Inhaltsübersicht

Seite

I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Schrifttumsübersicht	3
1. Definition der Plaques	3
2. Ätiologie und Genese der Plaques	3
3. Zusammensetzung der Plaques	7
III. Material und Methoden	11
A. Plaquesgewinnung und Probanden	11
B. Methodik und Versuchsanordnungen	11
1) Bestimmung der Nass- und Trockengewichtes	12
2) Bestimmung der Trübung	12
3) Bestimmung des Proteingehaltes	13
4) Bestimmung der nichtflüchtigen, organischen Substanzen	14
5) Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes	15
C. Statistische Auswertung der Ergebnisse	18
IV. Ergebnisse	19
V. Diskussion der Ergebnisse	27
VI. Zusammenfassung	31
VII. Schrifttum	32

I. Einleitung und Problemstellung

Die Bedeutung der Plaques für die Entstehung der Karies wurde schon frühzeitig von den Autoren WILLIAMS (1897), BLACK (1899), BUNTING und RICHARD'S (1914), COODLIDGE (1914) und HADLEY (1924) hervorgehoben. Im wesentlichen gilt auch heute noch die chemisch-parasitäre Kariestheorie von MILLER (1898). Im Mittelpunkt des Kariesgeschehens stehen die Plaques als ein fest haftender, histologisch strukturierter Belag von lebenden und abgestorbenen Mikroorganismen in einer polysaccharid- und glykoproteinreichen Matrix (SCHROEDER, 1969). In diesen Plaques entstehen durch bakteriell- enzymatische Prozesse saure Stoffwechselprodukte - vornehmlich aus leicht abbaufähigen Kohlenhydraten - die den Zahn entkalken können. In jüngerer Zeit bestätigten neue, kritische Arbeiten (BIBBY, et al., 1958; WINKLER und BACKER DIRKS, 1958; JENKINS, 1961), daß die chemisch parasitäre Kariestheorie von allen diskutierten ätiologischen Mechanismen experimentell am besten gestützt ist.

Eine Schlüsselstellung nehmen die Plaques auch im Rahmen der Parodontalerkrankungen ein (GÜLZOW, 1965). So schreibt beispielsweise RIETHE (1969): "Die Frage, ob Plaques oder Zahnstein von größerer kausaler Signifikanz für Entwicklung, Wachstum und Fortbestand parodontaler Erkrankungen sind, wurde zuletzt von SILNESS und LÖE (1964), LÖE et al. (1965), RAMFJORD et al. (1968) zugunsten der Plaques beantwortet." Auch SCHROEDER (1969) weist

diesen weichen, schmierigen Belägen eine Zentralstellung im *circulus vitiosus* zwischen supragingivalen Plaques-Zahnsteinablagerungen und entzündlichen Parodontalerkrankungen zu. Er hält die ursprüngliche Schädigung des marginalen Parodontiums aufgrund toxischer oder enzymatischer Beeinflussung durch Mikroorganismen aus der Plaques für denkbar. "Dieser Prozeß wird unterstützt durch die Ausbildung des supragingivalen Zahnsteines, der neue Retentionen und Schlupfwinkel entstehen läßt und neue Plaquesanhäufungen begünstigt." (SCHROEDER, 1962).

Die Tragweite der Plaques in der Ätiologie von Zahnkaries und Parodontalerkrankungen schlägt sich im Interesse nieder, das die Forschung diesen Belägen immer wieder zukommen läßt. In den meisten vergleichenden Untersuchungen wurde eine genau festgelegte Entstehungszeit für die Plaques (3-Tage-Plaques) vorausgesetzt. Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob zeitlich nicht standardisierte Plaques aus den vier Gebißquadranten desselben Probanden signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung aufweisen. Hierbei werden als Bezugsgrößen Nassgewicht, Trockengewicht und nephelometrische Messung der Trübung von in H_2O homogenisierten Plaquesproben diskutiert. Außerdem werden nicht flüchtige organische Substanzen der Plaques, ihr Eiweißgehalt und Gesamtstickstoffgehalt untersucht.

II. Schrifttum

1. Definition der Plaques

Der Begriff "plaques" wurde zum ersten Mal von BLACK (1898) verwendet, als er die "filzartigen" Ansammlungen beschrieb, die WILLIAMS (1897) bei Patienten an der Oberfläche kariöser Zähne beobachtet hatte. Heute wird wohl allgemein für diese Zahnauflagerungen die Definition von DAWES und Mitarbeitern (1963) akzeptiert, wonach Plaques die Deckschicht darstellen, die nach Reinigung der Zähne mit dem Spray auf der Zahnoberfläche zurückbleibt.

Auf dem Kariessymposium 1964 in Münster/Westfalen einigte man sich auf die Feststellung, daß "Plaques festhaftende Mukoproteidbeläge mit aktiven Mikroorganismen, gegebenenfalls unter Beimengungen von Nährsubstanzen sind (LEHNERT, 1968)".

2. Ätiologie und Genese

a) Ursachen der Plaquesbildung

Die lokalen Ursachen der Zahnbeläge sind vielfältiger Art. Mit Vorliebe lagern sie sich an den habituell unsaubereren Zonen des Gebisses ab. Aber auch die Beschaffenheit der Zahnoberfläche und die morphologischen Gegebenheiten im Bereich der Zahnhäule spielen eine Rolle (WILD, 1927; EGELBERG, 1969). Von WINKLER und BACKER DIRKS (1958), SCHROEDER und Mitarbeitern (1962), sowie WANNEN-MACHER (1963) wurde darauf hingewiesen, daß Ernährungsgewohnheiten, mangelnde Kaufunktion und Speichelveskosität die Plaquesbildung mitbeeinflussen.

Auch interne Erkrankungen wie Stoffwechselstörungen und Erkrankungen des Magen- Darm-Traktes sind als Ursache vermehrter Plaquesbildung anzusehen (SCHULTE, 1961), da sich Erkrankungen dieser Art an den Mundschleimhäuten und der Gingiva symptomatisch auswirken. Aufgrund der dann mangelnden natürlichen Selbstreinigung und vernachlässigter Mundhygiene von Seiten des Patienten kann die Belagbildung sekundär begünstigt werden.

b. Entstehungsweise der organischen Deckschicht und der Plaquesmatrix

Der Mechanismus der Plaquesbildung in der Mundhöhle des Menschen ist heute weitgehend erforscht (JENKINS, 1965; MANDEL, 1966). Untersuchungen von McDOUGALL (1963) und von BJÖRN und CARLSON (1964) zeigen, daß der erste Schritt zur Plaquesbildung in einer organischen, bakterienfreien Ablagerung auf der Zahnoberfläche besteht. Diese dünne, transparente Deckschicht ist zwischen 1 und 15 micron dick. Sie weist im Zahnhalsbereich die größte Stärke auf. Innerhalb von drei Tagen bildet sich diese Deckschicht an fast allen Flächen der Zähne (McDOUGALL, 1963).

Diese Kutikula soll sich durch Polymerisation und Denaturierung von Speichelbestandteilen bilden (KLEES und KLEES, 1958; TURNER, 1958; MECKEL, 1961; DAWES et al., 1963; LENZ und MÜHLEMANN, 1963; SCHROEDER et al., 1964; THEILADE, 1964). Auch von ERICSSON (1967) sowie von McGAUCHEY und STOWELL (1967) durchgeführte Absorptionsmessungen von Speichelproteinen und elektronenmikroskopische Untersuchungen von SAXTON (1973) unterstützen diese Ansicht. Einige Autoren (TRESTER und KLEINBERG, 1962; DAWES, 1964a;

SILVERMAN und KLEINBERG, 1967) gehen davon aus, daß die Plaquesbildung durch Säurefällung von Speichelprotein initiiert wird. Die Versuche von DAWES (1964) zeigen, daß mit Essigsäure versetzter Speichel erst bei einem pH-Wert von 3,5 zur Fällung kommt. Dagegen trat Fällung bei HCl versetztem Speichel bei höheren pH-Werten auf. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch JENKINS (1968). Entscheidend ist jedoch nach JENKINS, ob die Säuren, die von Bakterien gebildet werden, mit den Säuren der oben erwähnten *in vitro*-Versuche vergleichbar sind.

MIDDLETON (1965) fand, daß einige Proteinanteile des Speichels instabil sind und sich unter anderem bei neutralem pH sogar leicht auf der Oberfläche von Zähnen auflagern. Diese "spontane" Fällung sei unabhängig von bakterieller Aktivität, da sie auch mit "relativ sterilem" DrüsenSpeichel auftrat. Zu ähnlichen Ergebnissen war schon DAWES (1964) gekommen, der vor allem am Speichel der Submandibulardrüsen die Fähigkeit der spontanen Fällung nachgewiesen hatte. In einigen Fällen löste bereits die Benetzung der Oberfläche des Sammelgefäßes mit Speichel die Fällung aus.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Hinweis von JENKINS (1968), wonach Proteine aus den submaxillären Speicheldrüsen mehr zur Ausfällung neigen als die aus der Parotis. MECKEL (1965) sieht in dieser Deckschichtenauflagerung einen ersten Schutz gegen die Entkalkung des Schmelzes.

MCDUGALL (1963a,b) bezeichnet die oben erwähnte organische Deckschicht als "unreife Plaques" und setzt die zeitliche Begrenzung auf einen Tag fest. Danach beginnt die zweite Phase, die Anlagerung

von Mikroorganismen in die Deckschicht, der Prozess der Plaquesreifung.

Die Behauptung, daß die Plaquesmatrix sich hauptsächlich aus Speichelproteinen zusammensetze, wurde durch elektrophoretische Versuche von FERGUSON (1964) untermauert. Er konnte eine auffällige Ähnlichkeit der Speichelproteine und der losen Plaquesproteine aufzeigen. ARMSTRONG (1967) und SILVERMANN und KLEINBERG (1967) stellten in ihren Untersuchungen ebenfalls heraus, daß die Aminosäurezusammensetzung größtenteils mit der des unverdauten Speichels übereinstimmt. Die Elektronenmikrodiagramme von FRANK und BRENDEL (1966) scheinen anzuzeigen, daß die organischen Bestandteile von Kutikula und der Plaquesmatrix ähnlich seien. WINKLER und BACKER DIRKS (1958) vermuten, daß Speichelproteine direkt auf das Hydroxylapatid des Schmelzes angelagert und dort denaturiert werden. Auch McDUGALL (1963) und LEACH und SAXTON (1966) gehen davon aus, daß der Ursprung der Deckschicht im Speichel liegt. Bei bakterieller Besiedlung wird sie jedoch von den Keimen verbraucht. Die Autoren vermuten, daß die dann entstehende Plaquesmatrix bakteriellen Ursprungs sei, aber genaue Entstehungsabläufe werden nicht angegeben. Andere Autoren (CARLSON und EGELBERG, 1965; GIBBONS und BANGHART, 1967; WOOD und CRITCHLEY, 1967) sind jedoch der Ansicht, daß die Plaquesmatrix aus extrazellulären, bakteriellen Polysacchariden besteht. LEACH und HAYES (1968) konnten zeigen, daß die Bildung der Plaquesmatrix einmal durch den enzymatischen Verlust des Kohlenhydratenanteils von Speichelglycoproteinen durch Glycosidasen,

zum anderen durch enzymatische Polymerisation von Nahrungszuckern wesentlich unterstützt wird. Auch SILVERMANN und KLEINBERG (1967b) konnten nachweisen, daß Kohlenhydratanteile aus Nahrungsmitteln, vor allem Zucker, den bakteriellen Aufbau der Plaques erheblich beschleunigen können. JENKINS (1969) sieht in der durch Bakterien verursachten Säurebildung einen zusätzlichen Faktor für die Bildung weiterer Plaques.

3. Zusammensetzung der Plaques

Die Plaques bestehen in großer Menge aus Speichereiweiß, abgeschilferten Epithelien, feinverteilten, kleinen Nahrungsresten, hier vor allem Kohlenhydraten und zahlreichen Bakterienarten (WILD, 1941). Gewichtsmäßig stellt der Wassergehalt der Plaques den größten Anteil dar (JENKINS, 1966). DAWES und JENKINS (1962) fanden, daß die Plaques zu 80 % aus Wasser und zu 20 % aus festen Bestandteilen bestehen. SCHROEDER (1963) stellte in seinen Untersuchungen den unterschiedlichen Kalzium- und Phosphatgehalt der einzelnen Gebißregionen heraus. MANDEL (1966) sieht in dem unterschiedlichen Gehalt der Kalzium- und Phosphatsalze in den Plaques einen Hinweis auf Alter und Lokalisation. Muzine und Mucopolysaccharide wertet EGGERS-LURA (1954) als wichtigste Bestandteile von Plaques. KAZAKOWA (1952) nahm an, daß es sich bei den Muzinen um cholesterinhaltige Gluko-Lipo-Proteide handele. Nach LEUTHARD (1959) enthalten die Mucopolysaccharide Hexosen, Aminosucker, Aldoronsäure, Neuraminsäure und Sialuronsäure. Daneben wurden α -Galaktose und 1-Fruktose dargestellt (HANSON, 1961).

Nach neuerer Ansicht handelt es sich bei den Muzinen des Speichels um Mucoproteide, also um Verbindungen aus Kohlenhydraten und Proteinen. Unter den Nahrungsanteilen nehmen die Zucker die bedeutendste Stellung ein. Insbesondere Mono- und Disaccharide werden in den Plaques abgebaut. Dabei auftretende saure Intermediärprodukte sind als kariogene Noxen anzusehen (STEPHAN, 1948; BRAMSTEDT und Mitarbeitern, 1964). Den Muzinen teilt, wie bereits erwähnt, ERICSSON (1961) die Rolle der Matrix zu, auf der sich dann Bakterien festsetzen. In den Bakterien sehen zahlreiche Autoren eine wesentliche Komponente der Plaques (MILLER, 1898; WILLIAMS, 1943; OLITZKI, 1948; ROBINSON, 1952; MEYER, 1958 und ERICSSON, 1959). Die Tierversuche von ORLAND (1954) und FITZGERALD (1960) und KEYES (1959) bewiesen die Zentralstellung der Bakterien im Plaquesgeschehen. Außer Aerobiern wie Staphylokokken und Hefen (STRÄLFORS, 1950) werden in den Plaques Anaerobier wie ~~α~~-Streptokokken, Veillonellen, Proteus, Mesentericus und Neisserien gefunden. Über das Vorhandensein der einzelnen Arten gehen jedoch die Ansichten auseinander. Während z.B. STRÄLFORS (1950) die Aktinomyzeten in seinen Untersuchungen mit keinem Wort erwähnt, stellt ENNEVER (1951) fest, daß alle Plaques Aktinomyzeten enthalten und ROBINSON (1952) fand sogar ein Überwiegen dieser Bakterien. DAVIS und BAIRD-PARKER (1959) fanden aus der Gattung der Leptotrichiae am häufigsten den *L. buccalis* und *L. dentium*. Die unterschiedliche Verteilung des *Streptococcus salivarius* im Munde wurde von KRASSE (1954) aufgezeigt. Auch GIBBONS et al. (1964) kommen bei ihren Forschungen

zu ähnlichen Ergebnissen. Die Kariogenität der Streptokokkenarten ist abhängig von ihrer Fähigkeit, Säuren zu bilden. Dies zeigten Untersuchungen von FITZGERALD und KEYES (1960) und JORDAN (1965). RITZ (1967) fand in 1 bis 9 Tagen altem Plaquesmaterial der unteren und oberen Schneidezähne, daß in 1 Tag alten Plaquesproben Streptokokken, Neisserien und Nocardiae vorherrschten. In älteren Versuchsproben war eine Abnahme von aeroben Neisserien und Nocardiae und ein Wachstum der Streptokokken, Aktinomyzeten, Korynebakterien und Veillonellen festzustellen. Die elektronenmikroskopischen Studien von McMILLAN et al. (1959) zeigen deutlich Stäbchen-, Kokken-, Spiralen- und Fadenformen, wobei zahlreiche Stäbchenformen wie leere bzw. beinahe leere Zellen aussahen. Sie schlossen daraus, daß diese Zellen schon vor der Präparation leblos waren. Von SCHNEIDER und MÜHLEMANN (1959), sowie SCHROEDER (1961) und VAHL (1964) wurden Mylarfolien als "Plaques-Träger" an den lingualen Flächen der unteren Schneidezähne angelegt; nach einer Liegedauer zwischen 6 Stunden und 70 Tagen wurden sie entfernt, eingebettet, im Mikrotom geschnitten und gefärbt. Die lichtoptische, elektronenoptische und röntgenographische Untersuchung zeigte, daß 1 Tag alte Beläge vorwiegend aus grampositiven Mikroorganismen bestanden, die in eine Matrix aus Speichelmucoiden eingelagert waren.

Durch Färbung mit spezifischen, fluoreszierenden Antikörpern wies MECKEL (1968) in älteren reifen Plaques die Anwesenheit aerober Nocardien an der Plaquesoberfläche nach; in den tieferen Schichten konnte er sie nicht finden. Daraus schloß er, daß die

Gesamtzahl der anaeroben Veillonellen und Fusobakterien mit dem Alter der Plaques zunimmt und sich somit die topographische Beziehung der Bakterien innerhalb der Plaques von den tieferen Schichten zu den äußeren ändert.

Lichtmikroskopische Untersuchungen von MANDEL et al. (1957), TURESKY et al. (1961) und SLACK und BOWDEN (1965) setzen sich mit der bakteriellen Zusammensetzung der Plaques in Abhängigkeit vom Alter auseinander. Dabei fällt den Autoren die Vorherrschaft der Kokkenformen in den frühen Plaques auf, während bei der weiteren Plaquesentwicklung dann die Fadenformen zunehmen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von JONES (1972) zeigen die Vielzahl der Bakterienarten in den Plaques. Außerdem wird die unterschiedliche Kolonienbildung derselben, vernetzt mit extrazellulärem Material, vermutlich Polysacchariden beschrieben.

Besonders aber wird das Vorkommen der Spirochaeten hervorgehoben und deren Lokalisation in der subgingivalen Plaques und in den Interdentalräumen.

III. Material und Methoden

A) Plaquesgewinnung und Probanden

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Plaquesproben wahllos von Klinikpatienten entnommen. Das Alter der Beläge wurde nicht bestimmt.

Vor den Probenentnahmen erfolgte die Reinigung der entsprechenden Zahnflächen mit Spray und Luftbläser von eventuell vorhandenen Speiseresten und von Speichel. Danach wurden aus den vier Gebißquadranten separate Plaquesproben entnommen. Im Oberkiefer konnten die Plaques vornehmlich von den Bukkalflächen der Prämolaren und Molaren, im Unterkiefer insbesondere von den Lingualbereichen der Seitenzähne gewonnen werden. Jedem Gebißquadranten war ein gekennzeichnetes, sterilisiertes und mit der Mikrowaage genau abgewogenes Wägegläschen zugeordnet, in das die Plaques eingefüllt wurden. Ein sofortiges Verschließen der Gläschen nach den Probenentnahmen sollte Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung möglichst gering halten.

B) Methodik und Versuchsanordnungen

Von den nach oben beschriebener Art und Weise gewonnenen Versuchsproben wurden Nassgewicht, Trockengewicht, Trübung, Proteingehalt, Gehalt an nichtflüchtigen organischen Substanzen und Stickstoffgehalt ermittelt.

1. Bestimmung von Nass- und Trockengewicht

Das Nassgewicht der Plaquesproben ergibt sich aus der Gewichts-
differenz des mit Plaques beschickten zum leeren Wägegläschen.
Nach dreistündigem Trocknen der Plaquesproben im Vakuumexiccator
über Blaugel (Merck 1925) erfolgte eine neuerliche Wägung. Das
Trockengewicht subtrahiert vom Nassgewicht der diesbezüglichen
Probe ergibt den Wassergehalt der Plaques.

Die weiteren Untersuchungen erforderten eine wässrige Auf-
schwemmung der Plaquesproben. Um gleiche Versuchsbedingungen
zu erhalten, wurden pro 1 mg Plaques-Trockengewicht 3 ml
destilliertes Wasser zu jeder Probe gegeben. Diese Plaques-
aufschwemmungen homogenisierten wir anschließend unter Kühlung
3 Minuten lang im MSE-Ultraschalldesintegrator.

2. Bestimmung der Trübung

Nach erfolgter Homogenisierung wurde mit dem Spektralphoto-
meter PMQ II von Zeiss nephelometrisch die Trübung gemessen.
Als Bezugsgröße verwendeten wir eine konstante Vergleichs-
lösung von 0,5 mg Gelantine pro 1 ml destilliertem Wasser.
Bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm und bei einer Wellen-
länge von 546 nm lasen wir dann die Extinktion der einzelnen
Plaquesproben aus jedem Gebißquadranten gegen diesen Nullwert
ab.

3. Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Plaquesproben wurde entsprechend der Biuretmethode (ROBINSON und HODGEN, 1940) festgestellt, und zwar nach der von WEICHSELBAUM (1946) angegebenen Modifizierung des Verfahrens.

Dabei gaben wir 0,85 ml Plaquessuspension in ein auf 10 ml ge-
eichtes Zentrifugenglas. Hinzugefügt wurden 0,15 ml einer
3 m-Trichloressigsäure (Merck 807) und der Inhalt des Glases
auf dem Cenco-Whirlmix gut vermengt. Dabei fällt das Eiweiß
aus (ROBINSON, 1940). Hierauf zentrifugierten wir das gefällte
Eiweiß bei ca. 3000 U/min. ungefähr 20 Minuten lang ab und
saugten die überstehende Lösung anschließend mit einer an die
Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Glaspipette vorsichtig ab.
Der Eiweißniederschlag wurde dann in 5 ml Aqua dest. aufge-
wirbelt und mit 5 ml Biuretreagenz (Schuchard Bi 138) versetzt.
Die Proben blieben bei Zimmertemperatur 30 Minuten stehen.
Danach nahmen wir die Messung der Extinktion vor. Der kon-
stante Blindwert setzte sich aus der Mischung von 5 ml Wasser
und 5 ml Biuretreagenz zusammen. Verwendet wurde hierzu wieder
das Spektralphotometer PMQ II von Zeiss bei einer Wellenlänge
von 546 nm. Die Küvettenschichtdicke betrug 2 cm.

Die mit dem Photometer gemessenen Extinktionswerte der Plaques-
proben waren in mg Casein umzurechnen. Die hierzu benötigte
Eichkurve fanden wir folgendermaßen:

Es wurde eine Casein-Standardlösung angesetzt, indem man 0,4 g
Casein (Merck 2242) in 50 ml 0,25 n karbonatfreier Natronlauge

(Merck 9139) löste und dazu 40 ml H_2O hinzugab. Unmittelbar darauf wurden 2,5 ml einer 1 n HCl (Merck 9057) hinzugefügt und mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Aus dieser Lösung stellten wir mehrere Verdünnungsreihen her. Die aus diesen Verdünnungsreihen herausgenommenen Proben ließen wir durch die oben beschriebene, modifizierte Biuretmethode nach WEICHSEL-BAUM (1946) laufen. Aufgrund der jeweiligen Extinktionswerte mit bekannten Mengen Casein in den einzelnen Proben konnte die Eichkurve aufgezeichnet werden. Anhand dieser Eichkurve ließen sich die ermittelten Extinktionswerte der Plaquesproben in mg Casein umrechnen.

4. Bestimmung der nichtflüchtigen organischen Substanzen

Für die von JOHNSON (1949) beschriebene Methode stellten wir zunächst das benötigte Reagenz zusammen. Es wurden 0,5 g Natriumdichromat (Merck 6335) in 20 ml H_2O gelöst und mit 95 %-iger Schwefelsäure (Merck 731) zu 1 l aufgefüllt. Im Versuch versetzten wir jeweils 0,4 ml Plaqueslösung mit 1 ml JOHNSON'S Reagenz. Außerdem stellten wir zwei Blindwerte her, indem wir jeweils zu 0,4 ml dest. H_2O 1 ml JOHNSON'S Reagenz gaben. Die Plaquesproben und die zwei Blindwerte wurden gut durchgemischt und dann für genau 20 Minuten im Thermoblock auf 100 ° C gehalten. Nach Abschluß dieses Vorganges kühlten wir die Reagenzgläser mit Inhalt sofort in Eiswasser ab. Anschließend fügten wir jedem Reagenzglas 10 ml Aqua dest. hinzu. Einer der beiden Blindwerte wurde mit ungefähr 10 mg wasser-

freiem Natriumsulfit (Merck 6657) reduziert.

Nach kräftigem Mischen lasen wir im Spektralphotometer bei 440 nm Wellenlänge die Extinktionswerte ab. Die Küvetten-schichtdicke betrug 2 cm. Als Nullwert für das Photometer diente der mit Na_2SO_3 reduzierte Blindwert. Von dem nicht reduzierten Blindwert wurden alle gemessenen Extinktionswerte der Plaquesproben abgezogen und der erhaltene Wert in der Eichkurve in mg Casein umgesetzt.

Die Eichkurve für die hier beschriebene Methode erstellten wir mit Casein, wie unter 3. (Seite 13) angeführt, her.

Verwendung fand lediglich eine geringere Menge Casein: nämlich 0,125 g !

Diese Menge ergibt sich aus dem Bereich, für den die Methode nach JOHNSON verwendbar ist.

5. Bestimmung des Gesamtstickstoffes

Die Reaktionslösung für die LANG'sche Methode (1958) bestand aus folgenden Chemikalien, die genau in der angegebenen Reihenfolge zueinander gemischt werden mußten:

40,0 g Kaliumsulfat (Merck 5153) wurden in 250 ml dest. Wasser gelöst, eventuell unter Zuführung von Wärme. Vorsichtig pipettierten wir 2 ml Selenium-Oxychlorid (Schuchard Se 0 91) hinzu. Schrittweise wurden hierauf 250 ml konz. Schwefelsäure (Merck 731) hinzugegeben. Damit erhalten wir eine übersättigte Lösung, die erst nach einigem Stehen Verwendung findet. Der Bodensatz wird bei allen weiteren Untersuchungen nicht

mehr aufgewirbelt. Im Versuch vermengten wir den Plaquesprobeninhalt, der zu diesem Versuch noch einmal um das 10-fache verdünnt wurde, von 1 ml pro Reagenzglas (320° C erhitzbar) mit 0,2 ml LANG-Lösung. Zwei weitere Reagenzgläser bereiteten wir vor, wovon eines 1 ml dest. H₂O und 0,2 ml Reaktionslösung enthielt. Dieser Inhalt diente als Nullwert für die Extinktionsmessung. In das andere Reagenzglas pipettierten wir 1,2 ml konz. Schwefelsäure und fügten ein Thermometer bis 360° C zur Temperaturkontrolle hinzu. Im Gegensatz zu der bei LANG beschriebenen Versuchsanordnung (elektrisch beheiztes Sandbad mit Asbestabdeckung) kamen die Substratproben, der Blindwert und das Reagenzglas mit dem Thermometer in einen Thermoblock. Die Öffnungen im Thermoblock waren so angeordnet, daß die Reagenzgläser ungefähr im Winkel von 45° und 2,5 cm tief standen. Die gesamte Oberfläche des Blockes wurde mit einer dünnen, hochglanzspiegelnden Aluminiumfolie abgedeckt, in die Löcher gebohrt worden war, um die Reagenzgläser durch sie hindurch in den Thermoblock einführen zu können. Diese Anordnung bewirkte, daß jedes Reagenzglas zugleich als sein eigener Kondensator arbeitete, da der obere Teil kühler gehalten wurde als der untere, der die Probenmenge enthielt (siehe LANG 1958). Die spiegelnde Aluminiumoberfläche erlaubte im Gegensatz zur LANG'schen Asbestabdeckung eine größere Temperaturdifferenzierung zwischen dem oberen und unteren Teil der Reagenzgläser. Gesteuert wurde der Thermoblock durch einen eigens angefertigten elektronischen Regler, der eine sehr konstante Temperaturein-

haltung (Regelgröße: $0,6^{\circ}\text{C}$) erlaubte.

Die Reagenzgläser mit Plaqueslösung wurden innerhalb von 1,5 Stunden langsam, aber kontinuierlich auf 310° aufgeheizt. Eine weitere Stunde war diese Temperatur konstant zu halten. Anschließend entnahmen wir die Reagenzgläser und ließen sie auf $20^{\circ} - 27^{\circ}\text{C}$ abkühlen. Das Volumen in jeder Probe betrug jetzt ca. 0,1 ml. Bis zum Volumen von 10 ml wurde jedes Reagenzglas mit H_2O aufgefüllt. Von dieser Menge pipettierten wir 3 ml in ein neues Reagenzglas und verdünnten bis zum Gesamtvolumen von 4 ml mit dest. Wasser. Anschließend fügten wir 2 ml Nebler's Reagenz (Merck 9011) hinzu. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 500 nm und einer Küvettschichtdicke von 2 cm abgelesen. Die Extinktionswerte der Verdünnungsreihen einer Stickstoff-Standardlösung lieferten die Eichkurve zur Feststellung der endgültigen Werte für den Stickstoffgehalt der Plaquesproben. Die Standardlösung erhielt man durch Lösen von 1,179 g wasserfreiem Ammoniumsulfat (Merck 1216) in 250 ml einer 0,2 n Schwefelsäure (Merck 748). Dies ergab eine Konzentration von 1000γ Stickstoff pro ml. Durch 10-fache Verdünnung erhalten wir die gewünschte Konzentration von 100γ Stickstoff pro ml. Das Ammoniumsulfat wurde vor Verwendung mehrere Tage lang in einem Exiccator über Blaugel getrocknet. Danach durchliefen die Einzelproben der Verdünnungsreihen die Bestimmungsmethode nach LANG wie oben beschrieben. Die so gewonnenen Extinktionswerte lieferten die Meßpunkte zur Eichkurve, mittels derer wir dann

die Extinktionswerte der Plaquesproben in $\mu\text{g N}$ überführen konnten.

C) Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die bei allen Variablen (Trockengewicht, Wassergehalt, Trübung, Proteingehalt, nichtflüchtige organische Substanzen, Gesamtstickstoffgehalt) zu klärende Frage ist, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Lokalisationen (OK re, OK li, UK re und UK li) vorhanden sind. Im vorliegenden Fall handelt es sich um einen multiplen Mittelwertvergleich abhängiger Stichproben (Personen). Es wurde daher auf der Rechenanlage der Universität Erlangen-Nürnberg mit Hilfe des statistischen Programmsystems "STATSYS" für jede der sieben Variablen eine Varianzanalyse mit den Einflußgrößen Lokalisation (OK re und li, UK re und li) und Personen ohne Wiederholung gerechnet. Der kritische F-Wert auf dem 5 % Signifikanzniveau liegt für dieses Rechenprogramm bei 2,7.

Weiterhin wurden die 99 % Vertrauensintervalle der Mittelwerte ausgerechnet. Sie bezeichnen den Bereich, in den bei unendlich vielen weiteren gleichartigen Untersuchungen 99 % aller Mittelwerte fallen würden. Die Vertrauensgrenzen errechnen sich aus der Formel $VG = k \cdot s$, wobei k ein festgelegter Faktor ist, der von der Anzahl der Einzelwerte abhängt; er wurde aus den Tabellen von DOCUMENTA GEIGY entnommen. s entspricht der Standardabweichung der Einzelwerte.

Für die Berechnung der folgenden Abbildungen wurden alle ermittelten Werte auf 1 mg Plaques-Trockengewicht bezogen.

IV. Ergebnisse

In den folgenden Abbildungen sind stets die Mittelwerte aus 40 Versuchen sowie die 99 % Vertrauensintervalle der Mittelwerte angegeben. Signifikanzen wurden, wie beschrieben, mittels des STATSYS-Programmes geprüft.

Das sofort nach der Entnahme der Plaquesproben mit der Mikrowaage bestimmte Nassgewicht (Abb. 1) zeigt im Mittelwert in keinem der vier Quadranten signifikante Unterschiede. Bei einem F-Wert von 1,4 ($p > 0,05$) sind die erhaltenen Differenzen nicht signifikant.

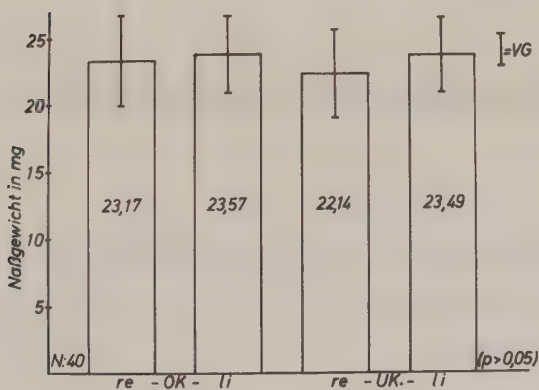


Abb. 1: Nassgewichtsbestimmung von Plaques aus den vier Gebißquadranten

Das Trockengewicht der Plaquesproben wurde nach dreistündiger Entwässerung der Beläge im Vakuumexsiccator über Blaugel ermittelt.

Es zeigt sich hier (Abb. 2), daß auch im Plaques-Trockengewicht bei einem F-Wert von 2,5 ($p > 0,05$) zwischen den vier Gebißquadranten keine statistisch auffällige Abweichungen nachweisbar sind.

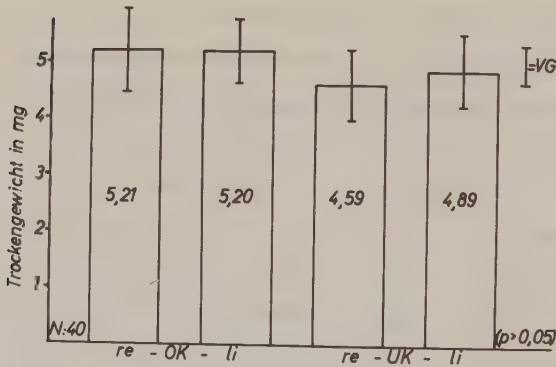


Abb. 2: Vergleichende Trockengewichtsbestimmungen von Plaques aus den vier Gebißquadranten

Der nach dreistündiger Trocknung der Plaquesproben ermittelte Gewichtsverlust entspricht dem Wassergehalt der Plaques. Der Wassergehalt zeigt nach dem Vergleich der Werte aller vier Quadranten mit der Varianzanalyse bei einem F-Wert von 1,7 ($p > 0,05$) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3).

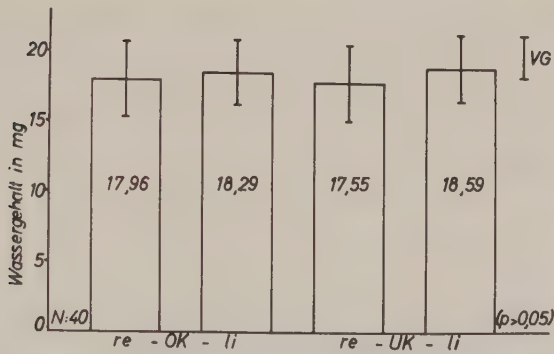


Abb. 3: Vergleichende Wassergehaltsbestimmungen von Plaques aus den vier Gebißquadranten

Da bei der Bestimmung der Trübung der homogenisierten, in destilliertem Wasser aufgeschwemmten Plaques der kritische F-Wert von 2,7 auf dem 5 % Signifikanzniveau mit einem Wert für $F = 3,5$ überschritten wurde und somit Signifikanzen auftraten, wurde zur weiteren Betrachtung der Tukey-Test angewendet, um zu klären, zwischen welchen Mittelwerten signifikante Unterschiede festzustellen sind.

Hierzu werden die vier Mittelwerte ($OK\ re = 0,6387$, $OK\ li = 0,6138$, $UK\ re = 0,6173$ und $UK\ li = 0,5940$) ihrer Größe nach geordnet und die Differenzen in Tabellenform aufgezeichnet:

	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_3$	$\bar{x}_4$
$\bar{x}_1$	0,0198	0,0235	<u>0,0448</u>
$\bar{x}_2$		0,036	0,025
$\bar{x}_3$			0,02145

Die kritische Testgröße qs_x des Tukey-Tests beträgt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % 0,03619.

Somit ist nur der Unterschied zwischen $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ ($OK\ re$ und $UK\ li$) statistisch auffällig, wie aus der Tabelle ersichtlich ist.

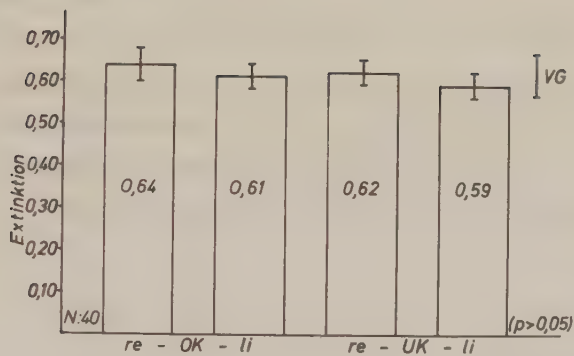


Abb. 4: Vergleichende Bestimmung der Trübung der homogenisierten und in destilliertem Wasser aufgeschwemmten Plaques aus den vier Gebißquadranten

Der Proteingehalt in der Plaques ist weitgehend von der Anzahl der darin vorhandenen Bakterien abhängig. Die vergleichende Proteingehaltsbestimmung bezieht sich also im wesentlichen auf die bakteriellen Anteile der Plaques in den vier Gebißquadranten. Die nach der modifizierten Biuretmethode (WEICHSELBAUM, 1946) ermittelten Werte (Abb. 5) zeigen bei einem F-Wert von 1,9 ($p \gg 0,05$) keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt der untersuchten Plaquesproben. Man kann deshalb annehmen, daß die Anzahl der Bakterien in den Belägen der vier Gebißquadranten nahezu gleich groß ist.

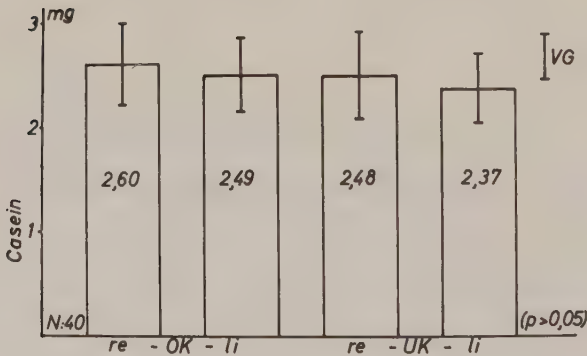


Abb. 5: Vergleichende Proteingehaltsbestimmungen in Plaques aus den vier Gebißquadranten.

In der vergleichenden Untersuchung der nichtflüchtigen, organischen Substanzen werden Kohlenhydrate, Fette und verwandte Stoffe als Gesamtes erfaßt. Die Ergebnisse geben damit natürlich keinen Aufschluß über den prozentualen Anteil der einzelnen Komponenten. Aus der Abb. 6 ist zu ersehen, daß sich diese Substanzen in ihrer Gesamtheit in allen vier Quadranten bei einem F-Wert von 2,3 ($p > 0,05$) nicht signifikant unterscheiden.

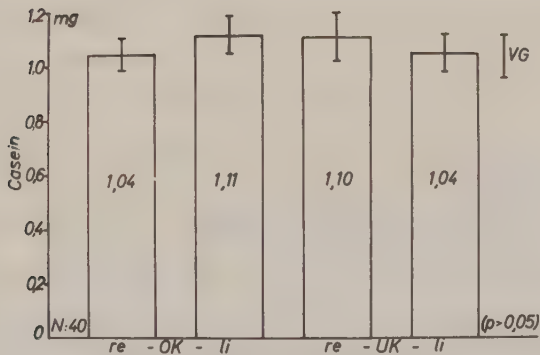


Abb. 6: Vergleichende Bestimmung der nichtflüchtigen, organischen Substanzen in Plaques aus den vier Gebißquadranten

Die in Abb. 7 aufgeführten Werte zeigen die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung des Stickstoffgehaltes von Plaques aus den vier Gebißquadranten. Die hierbei ermittelten Werte sind im wesentlichen ein Hinweis auf die in den Belägen vorhandenen Bakterienmengen. Deshalb bezieht sich auch diese Bestimmung auf die Gesamtzahl der Bakterien. Die vorliegende Untersuchung zeigt keine statistisch auffälligen Abweichungen in Bezug auf den Stickstoffgehalt von Plaques aus den vier verschiedenen Mundquadranten. Es ist aus diesen Ergebnissen in Ergänzung zu den Ergebnissen der Abb. 5 zu folgern, daß die Anzahl der Bakterien in den Plaques der vier Gebißquadranten nahezu gleich groß ist. Der F-Wert für diese Untersuchung beträgt 1,1 ($p > 0,05$).

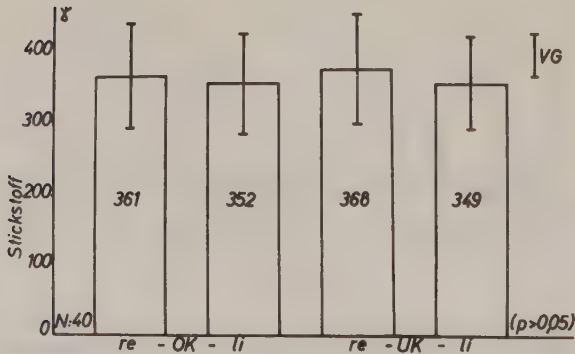


Abb. 7: Vergleichende Stickstoffbestimmungen in Plaques aus den vier Gebißquadranten

V. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden, vergleichenden Untersuchungen an menschlicher Plaques zeigen, daß altersmäßig nicht standardisierte Zahnplaques, die getrennt aus den vier Gebißquadranten gewonnen wurden, eine auffallend hohe Konstanz in der Zusammensetzung der untersuchten Bestandteile aufwiesen.

Neben der Bestimmung des Nassgewichtes wurden zunächst Trockengewicht und Wassergehalt ermittelt. Dabei ergab die Kontrolle des Trockengewichtes - bezogen auf 1 mg Plaques-Nassgewicht - bei der Auswertung mit Hilfe der Varianzanalyse keine statistisch gesicherten Unterschiede. Daraus wäre, als Erweiterung der Ergebnisse von AHRENS (1963) zu schließen, daß bei vergleichenden Studien an nicht standardisierten Plaques das Nassgewicht als Bezugsgröße herangezogen werden kann. Ebenso eindeutig sind die Resultate der Bestimmung des Trockengewichtes und Wassergehaltes. Auch diese Werte könnte man als Bezugsgröße für vergleichende Untersuchungen heranziehen; allerdings verlangen diese Methoden einen größeren Arbeitsaufwand und sind unter Umständen mit einem Materialverlust verbunden. Auch die nephelometrische Messung der wieder aufgeschwemmten, zuvor getrockneten Plaques gab keine Auffälligkeiten. Für diese und die folgenden Bestimmungen wurde das untersuchte Material auf 1 mg Plaques-Trockengewicht bezogen.

Die Bestimmung der Proteine zielt darauf hin, die Gesamtzahl der Keime in den Plaques der vier Gebißquadranten miteinander zu

vergleichen, da Eiweißstoffe aus den Plaques im wesentlichen bakteriellen Ursprungs sind. Die angewandte Biuretmethode ist nach WEICHSELBAUM (1946) möglicherweise das "typischste aller Maße für Eiweiß", da diese Methode in erster Linie eine Beziehung zur Konzentration der Peptid-Bindungen herstellt. Die Varianzanalyse der mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse zeigt deutliche Übereinstimmung in der Häufigkeit von Peptid-Bindungen in den Plaques der verschiedenen Gebißquadranten. Daraus darf geschlossen werden, daß die Gesamtzahl der Keime pro Maßeinheit Plaques in allen vier Kieferquadranten praktisch gleich ist. Allerdings können aufgrund dieser Untersuchung keine Rückschlüsse auf die Art der vorkommenden Keime gezogen werden. Um dies festzustellen, bedarf es spezifischer bakteriologisch-serologischer Untersuchungen. Versuche von DONOGHUE (1974), bei denen die Plaques von den vier Oberflächen zweier erster Prämolaren untersucht wurden, zeigten die mögliche Unterschiedlichkeit der Bakterienflora jeder einzelner Zahnoberfläche.

Auch die Bestimmung des Stickstoffgehaltes in den Plaques bezieht sich im wesentlichen auf die Anzahl der darin enthaltenen Keime. Die mit der Versuchsmethode nach LANG (1958) ermittelten Ergebnisse zeigten in der Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gebißquadranten. Man darf deshalb auch hieraus den Schluß ziehen, daß die Anzahl der Keime in allen vier Gebißquadranten praktisch gleich groß ist. Dies bestätigt die oben angeführten Resultate der Proteinbestimmung.

Die mit beiden Untersuchungsmethoden - Proteinbestimmung und Gesamtstickstoffbestimmung - gefundenen Ergebnisse werden auch durch die Untersuchungen von POOLE und GILMOUR (1971) bestätigt. Sie bestimmten durch direkte mikroskopische Betrachtung und nach anaerober Züchtung auf einem nicht selektiven Medium die Keimzahl in nicht standardisierten Plaques. Mittelwerte und Varianzen der wiederholt von Einzelpersonen erhaltenen Plaqueskeimzahlen unterschieden sich im allgemeinen nicht signifikant von solchen, die von verschiedenen Personen gewonnen worden waren. Auch JONES (1972) berichtete nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen über ähnliche Ergebnisse.

Eine weitere Einzelbestimmung der vorliegenden Arbeit bezieht sich auf die Summe der in den Plaques enthaltenen nichtflüchtigen, organischen Substanzen. Hierzu sind Kohlenhydrate, Fette, Eiweiße und verwandte Stoffe zu zählen. Diese Untersuchung zeigt ebenfalls beim Vergleich der Werte mit Hilfe der Varianzanalyse keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den vier Gebißquadranten. Daraus darf geschlossen werden, daß die Menge der nichtflüchtigen, organischen Substanzen pro Gewichtseinheit Plaques in allen vier Quadranten annähernd gleich ist. Aus den rechnerischen Ergebnissen kann jedoch nicht auf das Verhältnis der Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße zueinander geschlossen werden. Dazu müßten für die einzelnen Komponenten spezifische, biochemische Untersuchungen vorgenommen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß für keine der untersuchten Plaquesbestandteile eine statistisch signifikante Abweichung zwischen den aus den vier Gebißquadranten gewonnenen Belägen festzustellen war. Dies läßt den Schluß zu, daß altersmäßig nicht standardisierte Plaques in den vier Gebißquadranten annähernd gleiche Anteile der von uns untersuchten Substanzen enthalten. Daher könnte man die untersuchten Gruppen als Bezugsgröße für Untersuchungen heranziehen. Da aber nur die Bestimmung des Nassgewichtes ohne Substanzverlust vorgenommen werden kann, wird man aus Gründen der Einfachheit auf die anderen Bezugsgrößenbestimmungen verzichten, sofern nicht besondere Erfordernisse vorliegen.

VI. Zusammenfassung

Von 40 zufällig ausgewählten Klinikpatienten wurden getrennt aus den vier Gebißquadranten Plaquesproben entnommen. An diesen Proben wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Bestimmung des Nassgewichtes
2. Bestimmung des Trockengewichtes
3. Bestimmung des Wassergehaltes
4. Bestimmung der Trübung der wieder aufgeschwemmten Plaquesproben
5. Bestimmung des Proteingehaltes
6. Bestimmung der nichtflüchtigen, organischen Substanzen
7. Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes

Dabei stellte sich heraus, daß sich zwischen den Plaques aus den vier Gebißquadranten hinsichtlich der untersuchten Substanzen keine signifikanten Unterschiede ergaben. Danach erscheint es möglich auch im Alter nicht standardisierte Plaques für vergleichende Untersuchungen heranzuziehen.

VII. Schrifttum

1. Ahrens, G.; Bramstedt, F.; Naujoks, R.: Zur Standardisierung einzelner Bezugsgrößen für biochemische Untersuchungen
Orca 2, 167 (1964)
2. Armstrong, W. G.: The composition of organic films formed on human teeth
Caries Res.: 1, 89 (1967)
3. Bibby, B. G.; Gustafson, G. und Davies, G. N.: A critique of three theories of caries attack
Int. dent. J. 8, 685 (1958)
4. Bibby, B.: Concerning dental plaque
Caries Res.: 2, 97 (1968)
5. Björn, H. und Carlsson, J.: Observation on dental plaque morphogenesis
Odont. Revy 15, 23 (1964)
6. Björn, H. und Carlsson, J.: Beobachtungen über die Bildung von Zahnbelägen
Quintessenz 17, 2830 (1966)
7. Black, G. V.: Dr. Black's conclusions reviewed again
Dent. Cosmos 40, 440 (1898)
8. Black, G. V.: Susceptibility and immunity to dental caries
Dent. Cosmos 41, 826 (1899)

9. Bramstedt, F.; Ranke, E. und Naujoks, R.: Experimentelle Beiträge
zur Biochemie der Plaque und ihre Beziehungen
zur Zahnkaries
Orca 2, 173 (1964)
10. Bunting, R. W. und Rickert, U. G.: Dental caries
Bull. nat. dent. Ass. 1, 16 (1914)
11. Carlsson, J. und Egelberg, J.: Effect of diet on early plaque
formation in man
Odont. Revy 16, 112 (1965)
12. Coodlidge, E. D.: The etiology and progress of dental caries
Dent. Cosmos 56, 167 (1914)
13. Davies, G. H. G. und Baird-Parker, A. C.: The bacterial elements
of materia alba
Brit. dent. J. 106, 142 (1959)
14. Dawes, C. und Jenkins, G. N.: Some inorganic constituents of
dental plaque and their relationship to
early calculus formation and caries
Arch. oral Biol. 7, 161 (1962)
15. Dawes, C.; Jenkins, G. N. und Tonge, C. H.: The nomenclature of
the integuments of the enamel surface of
teeth
Brit. dent. J. 115, 65 (1963)
16. Dawes, C.: Further studies related to the formation of
dental plaque
J. dent. Res. 43, 835 (1964a)

17. Dawes, C.: Is acid-precipitation of salivary proteins
a factor in plaque formation
Arch. oral Biol. 9, 375 (1964b)
18. Donoghue, H. D.: Composition of dental plaque obtained from
eight sites in the mouth of a ten year-old
girl
J. dent. Res. 5, 1289 (1974)
19. Egelberg, J.: A review of the development of dental plaque
A symposium held in the University of Dundee
D. C. Thompson Co. Ltd., Scotland (1969)
20. Eggers-Lura, H.: Untersuchungen über den aeroben und an-
aeroben Abbau der Kohlenhydrate im Speichel
Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk. 21, 97 (1954)
21. Ennever, J. J.; Robinson, H. B. G. und Kitchin, P. C.: Actinomyces
and the dentobacterial plaque
J. dent. Res. 30, 88 (1951)
22. Ericsson, Y.: Die Beziehung zwischen Speichel und Karies
Dtsch. zahnärztl. Z. 16, 164 (1961)
23. Ericsson, Y.: Adsorption to hydroxyapatite of protein and
conjugated proteins from human saliva
Caries Res. 1, 52 (1967)
24. Ferguson, D. B.: The electrophoresis of dental plaque
J. dent. Res. 43, 956 (1964)

25. Fitzgerald, R. J.; Jordan, H. V. und Stanley, H. R.:
*Experimental caries and gingival pathologic
changes in the gnotobiotic rat*
J. dent. Res. 39, 923 (1960)
26. Fitzgerald, R. J. und Keyes, P. H.: Demonstration of the etiologic
*role of streptococci in experimental caries
in the hamster*
J. Amer. dent. Ass. 61, 9 (1960)
27. Frank, R. M. und Brendel, A.: Ultrastructure of the approximal
*dental plaque and the underlying normal and
cariou enamel*
Arch. oral Biol. 11, 883 (1966)
28. Gibbons, R. J.; Kapsimalis, B. und Sokransky, S. S.:
Source of salivary bacteria
Arch. oral Biol. 9, 101 (1964)
29. Gibbons, R. J. und Banghart, S. B.: Synthesis of extracellular
*dextran by cariogenic bacteria and its
presens in human dental plaque*
Arch. oral Biol. 12, 11 (1967)
30. Grøn, P.; Yao, K. und Spinelli, M.: A study of inorganic
constituents in dental plaque
J. dent. Res. 48, 799 (1969)
31. Gülzow, H. J.: *Die Mundhygiene in ihren Beziehungen zum
marginalen Parodontium und zur Kariesfrequenz*
Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk. 44, 97 (1965)

32. Hadley, P.: Bacteriology of dental caries
Dent. Cosmos 66, 707 (1924)
33. Hanson, H.: Zusammensetzung und Funktion des Speichels
Dtsch. zahnärztl. Z. 16, 147 (1961)
34. Irvin, M. und Leaver, A. G.: Biochemical analysis of human salivary
mucin
J. dent. Res. 36, 100 (1957)
35. Jenkins, G. N.: A critique of the proteolysis-chelation
theory of caries
Brit. dent. J. 111, 311 (1961a)
36. Jenkins, G. N.: The chemistry of dental plaque
An. N. Y. Acad. Sci. 131, 786 (1965)
37. Jenkins, G. N.: The influence of environmental fluids on
enamel solubility
J. dent. Res. 45, 662 (1966)
38. Jenkins, G. N.: The mode of formation of dental plaque
Caries Res. 2, 130 (1968)
39. Jenkins, G. N.: Composition and formation of dental plaque
Parodontologic 23, 30 (1969)
40. Johnson, M. J.: A rapid micromethod for estimation of
nonvolatile organic matter
J. biol. Chem. 181, 707 (1949)
41. Jones, S.: Natural plaque on tooth surface: a scanning
electron microscope study
Apex 5, 93 (1971)

43. Jones, S.: The tooth surface in periodontal disease
Dent. Practit. dent. Rec. 22, 462 (1972)
44. Jordan, H. V.: Bacteriological aspects of experimental
dental caries
An. N. Y. Acad. Sci. 131, 905 (1965)
45. Jordan, H. V. und Keyes, P. H.: In vitro methods for the study
of dental plaque formation and caries lesions
Arch. oral Biol. 11, 793 (1966)
46. Kazakowa, M. E.: zit. bei Irvin, M. und Leaver, A. G.:
Biochemical analysis of human salivary mucin
J. dent. Res. 36, 100 (1957)
47. Keyes, P. H.: Further observation regarding the inoculation
and transmission of experimental dental caries
J. dent. Res. 38, 684 (1959)
48. Klees, L. und Klees, K.: Über die Regenerationsfähigkeit des
Schmelzoberhäutchens
Stoma (Heidelb.) 11, 58 (1958)
49. Kleinberg, I.: Studies on dental plaque I
The effect of different concentrations of
glucose on the pH of dental plaque in vivo
J. dent. Res. 40, 1087 (1961)
50. Knox, K. W. und Still, J. L.: Observations on the salivary mucoids
J. dent. Res. 32, 379 (1953)

51. Krasse, B.: The proportional distribution of streptococcus salivarius and other streptococci in various parts of the mouth
Odont. Revy 5, 203 (1954)
52. Lang, C. A.: Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials
Analyt. Chem. 30, 1692 (1958)
53. Leach, S. A.: The acquired integuments of the teeth
Brit. dent. J. 122, 537 (1967)
54. Leach, S. A. und Saxton, C. A.: An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors
Arch. oral Biol. 11, 1081 (1966)
55. Leach, S. A. und Hayes, M. L.: A possible correlation between specific bacterial enzyme activities, dental plaque formation and cariogenicity
Caries Res. 2, 38 (1968)
56. Lehnert, S.: Biochemische und mikrobiologische Untersuchungen über Korrelation zwischen Speichel und Karies
Carl Hanser, München 1968
57. Lenz, H. und Mühlemann, H. R.: In vivo and in vitro effects of saliva on etched or mechanically marked enamel after certain periods of time
Helv. odont. Acta 7, 30 (1963)

58. Leuthard, F.: *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*
14. Aufl.
W. de Gruyter, Berlin 1959
59. Mandel, I. D.; Levy, B. M. und Wasserman, B. H.: *Histochemistry*
of calculus formation
J. Periodont. 28, 132 (1957)
60. Mandel, I. D.: *Dental plaque: nature, formation and effects*
J. Periodont. 37, 357 (1966)
61. Mandel, I. D.: *Histochemical and biochemical aspects of*
calculus formation
Periodontics 1, 43 (1963)
62. McDougall, W. A.: *Studies on dental plaque I: the histology*
of dental plaque and its attachment
Aust. dent. J. 8, 261 (1963)
63. McDougall, W. A.: *Studies on dental plaque II: the histology*
of the developing interproximal plaque
Aust. dent. J. 8, 398 (1963)
64. McGauchey, Ch. und Stowell, E. L.: *The adsorption of salivary*
proteins by hydroxyapatite
Proc. 44th meeting I.A.D.R., N. Amer. Div.
Abstract 456 (1966b)
65. McMillan, L.; Burill, D. Y. und Fosdic, L. S.: *A comparison of*
caries-immune and caries-susceptible dental
plaque by means of the electronmicroscope
J. dent. Res. 38, 696 (1959)

74. Poole, A. E. und Gilmour, M. N.: The variability of unstandardized plaque obtained from single or multiple subjects
Arch. oral Biol. 16, 681 (1971)
75. Riethe, P.: Plaque und Parodontium
Dtsch. zahnärztl. Z. 24, 915 (1969)
76. Ritz, H. L.: Microbial population shifts in developing human dental plaque
Arch. oral Biol. 12, 1561 (1967)
77. Robinson, G. V.: Bacteriology of dental caries
Oral Surg. 5, 1223 (1952)
78. Robinson, H. W.: zit. bei Beisenherz, G.; Boltzke, H. J.;
Bücher, Th.; Czok, R.; Garbade, K. H.;
Meyer-Ahrend, E. und Pfeleiderer, G.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-
Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-
phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus
Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
79. Saxton, C. A.: Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque
Caries Res. 7, 102 (1973)

80. Silverman, G.; Kay, M. und Kleinberg, J.: Chemical binding between
the macromolecular constituents of dental
plaque
I.A.D.R. Abstracts #394(1965)
81. Silverman, G. und Kleinberg, J.: Fractionation of dental plaque
and the characterization of its cellular and
acellular components
Arch. oral Biol. 13, 1387 (1967)
82. Silverman, G. und Kleinberg, J.: Studies on factors affecting the
aggregation of the microorganisms in human
dental plaque
Arch. oral Biol. 12, 1407 (1967b)
83. Slack, G. L. und Bowden, G. H.: Preliminary studies of experimental
dental plaque in vivo
Advanc. in Fluor. Res. and dent. Caries
Prev. 3, 193 (1965)
84. Schneider, U. K. und Mühlemann, H. R.: Frühstadium der Zahnkaries
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 69, 755 (1959)
85. Schroeder, H. E. und Marthaler, T. M.: Normierte Folien als Zahn-
steinträger
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 71, 596 (1961)
86. Schroeder, H. E.; Schait, A. und Mühlemann, H. R.:
Frühstadien der Zahnsteinbildung und ihre
chemische Beeinflussung
Dtsch. zahnärztl. Z. 17, 1606 (1962)

87. Schroeder, H. E.: Inorganic content and histology of early dental calculus in man
Helv. odont. Acta 7, 17 (1963)
88. Schroeder, H. E.; Lenz, H. und Mühlemann, H. R.: Microstructures and mineralization of early dental calculus
Helv. odont. Acta 8, 1 (1964)
89. Schulte, W.: Marginale Parodontitis und Magensekretion-weitere Ergebnisse
Dtsch. zahnärztl. Z. 16, 740 (1961)
90. Stephan, R. M.: Relativ importance of polysaccharides, disaccharides and monosaccharides in the production of caries
J. Amer. dent. Ass. 37, 530 (1948)
91. Stephan, R. M.: The dental plaque in relation to the etiology of caries
Int. dent. J. 4, 180 (1953)
92. Strålfors, A.: Investigation into the bacterial chemistry of dental plaque
Odont. T. 58, 155 (1950)
93. Theilade, J.: Electron microscopic study of calculus attachment to smooth surface
Acta odont. scand. 22, 379 (1964)

94. Trester, P. H. und Kleinberg, J.: Studies on the mechanism of
dental plaque formation
Proc. 40th meeting J.A.D.R. Amer. Div.
Abstract 62 (1962)
95. Turesky, S.; Renstrup, G. und Glickman, I.: Early calculus formation
in children and adults
J. Periodont. 32, 7 (1961)
96. Turner, E. P.: The integument of the enamel surface of
the human tooth
Dent. Practit. dent. Rec. 8, 373 (1964)
97. Vahl, J.; Höhling, H. J.; Güllenstern, F. und Wannenmacher, E.:
Ein Beitrag zur elektronenoptischen und
röntgenographischen Untersuchung supragingivaler
Beläge auf Zahnfolien
Dtsch. Zahnärztebl. 18, 1 (1964)
98. Wannenmacher, E.: zit. in Hofer, O.; Reichenbach, E.; Spreter
von Kreutenstein, Th. und Wannenmacher, E.:
Lehrbuch der klinischen Zahnheilkunde
3. Aufl. J. A. Barth, Leipzig 1963
99. Weichselbaum, T. E.: An accurate and rapid method for determination
of proteins in small amounts of blood serum
and plasma
Amer. J. clin. Path. 16, 40 (1946)

100. Williams, J. L.: A contribution to the study of the
pathology of enamel
Dent. Cosmos 39, 269 (1897)
101. Williams, C. H. M.: zit. bei Nyrop, E.: Ernährung und Zahnkaries
J. A. Barth, Leipzig 1943
102. Winkler, K. G. und Baker-Dirks, O.: The mechanism of dental plaque
Int. dent. J. 8, 561 (1958)
103. Wood, J. M. und Critchely, P.: The extracellular polysaccharide
produced from sucrose by a cariogenic strepto-
coccus
Arch. oral Biol. 11, 1039 (1966)

Herrn Prof. Dr. H.-J. Gültow danke ich
für die Überlassung des Themas und seine
freundliche Mithilfe bei der Ausarbeitung.

Lebenslauf Zahnarzt Thomas M. Liebel - 85 Nürnberg,
Witzlebenstr. 1

Persönliches:

- 16.7.1943 geb. als zweiter Sohn des Oberstleutnants
Julius Liebel und seiner Frau Hedwig, geb.
Forster in Wünsdorf/Kreis Teltow
- 1949 - 52 Besuch der Volksschule in Gräfelting bei
München
- 1952 - 54 Besuch der Volksschule in Nürnberg
- 1954 - 56 Besuch der Oberrealschule an der Wölckernstraße,
Nürnberg
- 1956 - 65 Besuch des Melanchthon-Gymnasiums
- 20.7.1965 Reifeprüfung des Melanchthon-Gymnasiums, Nürnberg
- 22.10.1965 Immatrikulation an der Friedrich-Alexander-
Universität, Erlangen-Nürnberg
- 2.11.1966 Zahnärztliche Vorprüfung/I. Teil
- 30.4.1969 Zahnärztliche Vorprüfung/II. Teil
- 30.12.1971 Beendigung des Studiums mit dem Staatsexamen
an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-
Nürnberg
- 1.1.1972 -
- 15.8.1972 Assistenz Zahnarzt in der prothetischen Abteilung
der Medizinischen Hochschule, Hannover
- 16.8.1972 Verwalter der Geschäfte eines wissenschaftlichen
Assistenten in der Poliklinik für Zahnerhaltung
und Parodontologie der Universitäts-Klinik und
Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkranke in
Erlangen

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990